巨大侧耳原生质体制备条件的优化

骈永茹[1,2]，李婧怡[1,3]，李勤奋[1,3]，王欢[4]，李玉[5]，杨阳[1,3*]

（1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带农业绿色低碳重点实验室，海口 571101；2. 华中农业大学植物科学技术学院应用真菌研究所，武汉 430070；3. 国家农业环境儋州观测实验站，海南 儋州 571700；4. 长春中医药大学，长春 130117；5. 吉林农业大学食药用菌教育部工程研究中心，长春 130118）

摘　要：为优化巨大侧耳原生质体的制备条件，该研究以两株不同温型的巨大侧耳菌株 PG46 和 PG79 为材料，采用单因素和正交试验方法，对原生质体制备的菌丝体菌龄、稳渗剂种类、溶壁酶浓度、酶解温度和酶解时间进行研究。结果表明：（1）在单因素实验中，巨大侧耳原生质体制备的适宜条件为菌龄 5 d，溶壁酶浓度 2.5%，0.6 mol·L^{-1} 的甘露醇稳渗剂，32 ℃（PG46）或 27~35 ℃（PG79）酶解 4 h。（2）正交试验验证并优化了单因素实验结果，组合 2（菌龄 5 d，溶壁酶浓度 2.5%，0.6 mol·L^{-1} 的甘露醇，32 ℃酶解 4 h）为 PG46 和 PG79 原生质体制备的最适条件，原生质体得率分别为 1.12×10^{7} CFU·mL^{-1} 和 7.28×10^{6} CFU·mL^{-1}。（3）*F-test* 检验中，各因素对原生质体制备的影响程度依次为菌龄＞溶壁酶浓度＞酶解温度＞酶解时间（PG46），菌龄＞酶解时间＞酶解温度＞溶壁酶浓度（PG79）。综上所述，两株不同温型巨大侧耳菌株的原生质体制备条件基本一致，菌龄对两菌株原生质体得率的影响程度最显著。该研究结果可为后续巨大侧耳的杂交育种、遗传转化、全基因组测序等工作奠定基础，进一步推动巨大侧耳分子遗传学的发展。

关键词：巨大侧耳，不同温型，热区，原生质体产量，制备条件

中图分类号：Q94　　　　　　　　**文献标识码：**A

Optimization of protoplast preparation conditions of *Pleurotus giganteus*

PIAN Yongru[1,2], LI Jingyi[1,3], LI Qinfen[1,3], WANG Huan[4], LI Yu[5], YANG Yang[1,3*]

（1. *Key Laboratory of Low Carbon Green Agriculture in Tropical China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*, Haikou 571101, China; 2. *Institute of Applied Mycology, College of Plant Science Technology, Huazhong Agricultural University,* Wuhan 430070, China; 3. *National Agricultural Experimental Station for Agricultural Environment*, Danzhou 571700, Hainan, China; 4. *Changchun University of Chinese Medicine*, Changchun 130117, China; 5. *Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University*, Changchun 130118, China）

Abstract: In order to obtain the optimal conditions for the protoplast preparation of *Pleurotus giganteus*, two strains, PG46 and PG79, with different temperature types, were selected as

基金项目：海南省自然科学基金（322QN365）；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项（1630042022003，1630042022020）[Supported by Hainan Provincial Natural Science Foundation of China (322QN365); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (1630042022003, 1630042022020)]。

第一作者：骈永茹（1999-），硕士研究生，研究方向为食用菌遗传育种，（E-mail）pianyongru@163.com。

*通信作者：杨阳，博士，助理研究员，研究方向为食用菌种质资源评价和遗传育种，（E-mail）yyjob1992@163.com。

materials to study the effects of five factors (mycelial age, osmotic stabilizer type, lywallzyme concentration, enzymatic hydrolysis duration and enzymatic hydrolysis temperature) based on single-factor and orthogonal experimental methods. The results were as follows: (1) In the single factor test, the optimal conditions for the protoplast preparation of *P. giganteus* were mycelial culture for 5 days, using 2.5% lywallzyme with 0.6 mol·L^{-1} mannitol, incubated for 4 h at 32 ℃ (PG46) or 27−35 ℃ (PG79). (2) Orthogonal experiment verified and optimized the single factor test results. Combination 2 (mycelial age 5 d, lywallzyme concentration 2.5%, 0.6 mol·L^{-1} mannitol, incubated for 4 h at 32 ℃) was the optimal condition for the protoplast preparation of PG46 and PG79, and the protoplast yields were 11.2 × 10^{6} CFU·mL^{-1} and 7.28 × 10^{6} CFU·mL^{-1}, respectively. (3) For *F-test*, the influence degree of various factor on the protoplast preparation were as follows: mycelial age>lywallzyme concentration>enzymatic hydrolysis temperature>enzymatic hydrolysis duration (PG46), and mycelial age>enzymatic hydrolysis duration>enzymatic hydrolysis temperature>lywallzyme concentration (PG79), respectively. In conclusion, the protoplast preparation conditions of the two *P. giganteus* strains with different temperature types were basically the same, and the effects of mycelial age on the protoplasts yield of the two strains was the most significant. The results can lay a foundation for further cross-breeding, genetic transformation, whole genome sequencing and promote the molecular genetics development of *P. giganteus*.

Key words: *Pleurotus giganteus*, different temperature types, tropics, protoplast yield, preparation conditions

巨大侧耳（*Pleurotus giganteus*），是国内开发的一种珍稀食用菌，其口感和风味独特，有猪肚般的滑腻，因而具有商品名“猪肚菇”（董洪新等，2010；Karunarathna et al., 2012）。巨大侧耳营养丰富，富含多糖、蛋白质、粗纤维等营养物质，并且具有抗炎、抗肿瘤、抗真菌、保护肝脏等多种药用功效，深受消费者喜爱（Phan et al., 2014；Paravamsivam et al., 2016）。前人研究发现，巨大侧耳环境适应性强、生物学转化率高，并且适宜在温度较高的夏季栽培，对调节食用菌市场供应和反季节栽培，特别是热区食用菌生产具有重要意义（于海龙等，2021）。随着栽培面积的不断扩大，巨大侧耳的遗传育种工作尤为重要（吴碧君，2020）。原生质体是指完整细胞去除细胞壁后，裸露出的一个具有生理功能的圆球体，仍含有整套的遗传信息，并且具有较好的生理活性，是食用菌分子遗传学研究的良好材料（Muralidhar & Panda, 2000)）。近年来，原生质体单核化技术，已成功应用到食用菌生理生化、菌种复壮、遗传转化、遗传育种和全基因组测序等工作中（Dai et al., 2017；Sugano et al., 2017；Raman et al., 2021；刘海娟，2021），极大地推进了食用菌研究的深入开展。因此，对巨大侧耳原生质体制备进行系统研究，有助于进一步推进巨大侧耳遗传育种工作的开展。

目前，关于原生质体的制备在糙皮侧耳（Peng et al., 1993）、刺芹侧耳（Obatake et al., 2003）、黄白侧耳（Mizoguchi et al., 2006）、灵芝（李钦艳等，2016）、木耳（崔玮洁等，2019）和双孢蘑菇（李良敏等，2020）等多个食用菌物种中得到广泛研究。研究发现，原生质体的制备属于一种酶促反应过程，其影响因素十分复杂，不同菌株甚至同一菌株不同生理状态下，其原生质体制备条件也不尽相同。苏文英等（2020）发现，菌龄是原生质体制备的重要因素，玉木耳菌株在不同菌龄下，其原生质体制备条件存在较大差异。彭智华等（2000）基于单一变量原则，对 1 株野生巨大侧耳菌株的原生质体分离条件进行研究，发现原生质体产量会受到酶解液、稳渗剂、菌龄和 pH 的影响，并筛选到适宜的原生质体制备条件，但其制备率和再生率仍不高。邹彰毅和邓百万（2020）、孙佳星等（2022）基于正交试验和响应面法，进一步优化了单因素结果，分别获得了姬松茸和玉木耳原生质体制备的最优条件，极

大地提高了原生质体产量和质量。可见，原生质体的制备受到多种因素的影响，且各因素间的交互作用也十分重要。然而，关于巨大侧耳原生质体制备的研究较少，各因素对原生质体产量的影响程度及各因素间的交互作用也尚不明确，在一定程度上限制了巨大侧耳遗传育种工作的快速发展。

因此，本研究以前期筛选到的两株不同温型的巨大侧耳菌株为材料，采用单因素和正交试验的方法，对巨大侧耳原生质体制备中的菌丝体菌龄、溶壁酶浓度、稳渗剂种类、酶解温度和时间共 5 个关键影响因子进行研究。以期明确两株不同温型巨大侧耳菌株的原生质体制备条件及差异，针对性提高巨大侧耳原生质体制备效率。通过项目研究，可为进一步开展巨大侧耳的杂交育种、全基因组测序和品种改良等奠定良好基础，进而有效推动巨大侧耳遗传育种工作的深入开展。

1 材料与方法

1.1 材料

两株不同温型的巨大侧耳菌株，分别为高温型菌株 PG46 和中温型菌株 PG79（表 1）。菌种现保存于中国热带农业科学院环境与植物保护研究所菌种保藏中心。

表 1 两株巨大侧耳菌株的信息

Table 1 Information of two *Pleurotus giganteus* strains

菌株 Strains	来源 Source	类型 Type	出菇温度 Production temperature	ITS 序列号 ITS No.
PG46	海南省 Hainan Province	栽培 Cultivated	26~30 ℃	NMDCN000175M
PG79	海南省 Hainan Province	栽培 Cultivated	22~24 ℃	NMDCN000175L

MYG 液体培养基：麦芽糖 10 g，葡萄糖 5 g，酵母浸粉 5 g，加水混匀后，定容至 1 L。

再生培养基：麦芽糖 10 g，葡萄糖 5 g，酵母浸粉 5 g，琼脂 20 g，0.6 mol·L^{-1} 甘露醇，加水混匀后，定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 原生质体制备

将活化好的菌丝体接入 MYG 液体培养基中，于转速 150 r·min^{-1}，26 ℃恒温暗培养 7 d。无菌条件下，过滤菌丝体，并先后用无菌水和稳渗剂（0.6 mol·L^{-1} 的甘露醇）各冲洗 2 次。将菌丝体置于滤纸上吸干，并称取 300 mg 左右放入 1.5 mL 离心管中，加入 3 倍体积的 2.0%浓度的溶壁酶溶液（0.02 g 溶壁酶，1 mL 的 0.6 mol·L^{-1} 甘露醇）。轻搅混匀后放入 30 ℃的恒温金属浴中，酶解 4 h 得到原生质体粗提液。用无菌脱脂棉过滤后，3 000 r·min^{-1} 离心 5 min，倒掉上清液。用 0.6 mol·L^{-1} 的甘露醇轻轻冲洗管壁 2 次，去除多余酶解液，加入 1 mL 的 0.6 mol·L^{-1} 甘露醇以悬浮沉淀，制成原生质体原液。

1.2.2 原生质体再生

用 0.6 mol·L^{-1} 的稳渗剂，将原生质体原液稀释不同倍数，并在血球计数板下计数。分别吸取 200 μL 各稀释倍数的原生质体溶液，均匀涂布到再生培养基上，无菌水稀释的原生质体作对照。将实验组和对照组均置于 26 ℃恒温暗培养，每天观察菌落再生情况。

1.2.3 单因素实验

分别设置菌龄（3、5、7、9、11 d）、溶壁酶浓度（1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%）、稳渗剂种类（甘露醇、山梨醇、蔗糖、硫酸镁、氯化钾）、酶解温度（25、27、30、32、35、38 ℃）和酶解时间（2、3、4、5、6 h）共 5 个处理因素（崔玮洁等，2019；苏文英等，2020），

每个实验设置 5 次重复，统计各因素对不同温型巨大侧耳菌株原生质体产量的影响。

1.2.4 正交试验

在单因素实验基础上，分别选取菌龄、溶壁酶浓度、酶解温度和酶解时间为考察因素，以原生质体产量为响应值，组成 4 因素 3 水平的正交试验（表 2），以确定巨大侧耳原生质体制备的最适条件。

表 2 正交试验设计因素与水平

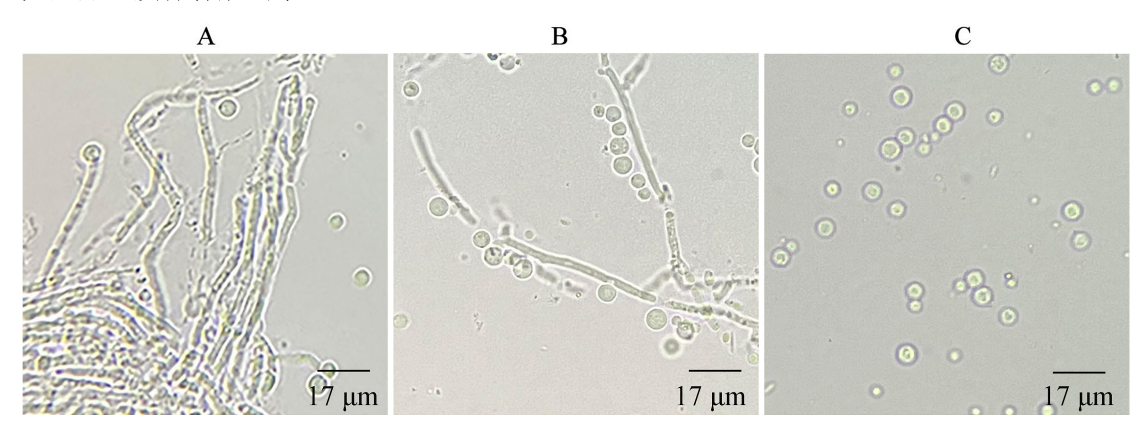
Table 2 Factors and levels of orthogonal experimental design

因素 Factor	编码 Code	水平 Level 1	 2	 3
菌龄 Mycelial age (d)	A	5	7	9
溶壁酶浓度 Lywallzyme concentration (%)	B	2.0	2.5	3.0
酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature (℃)	C	30	32	35
酶解时间 Enzymatic hydrolysis duration (h)	D	3	4	5

2 结果与分析

2.1 原生质体的释放

将两菌株的菌丝体置于溶壁酶溶液中，在适宜温度下进行酶解。每隔半小时取一次样，置于血球计数板中，在显微镜下观察原生质体的释放情况。结果显示，巨大侧耳的原生质体释放分为 3 个阶段（图 1）：首先，少量原生质体从菌丝体尖端释放；然后，部分菌丝体侧壁破裂，原生质体从菌丝体侧面释放；最后，随着酶解时间的延长，多数菌丝体细胞壁破裂，大量原生质体释放出来。



A. 前期，尖端释放；**B**. 中期，侧壁释放；**C**. 后期，大量释放。

A. Early stage, tip release; **B**. Middle term, side release; **C**. Later stage, a large amount of release.

图 1 显微镜下原生质体释放的部分图片

Fig. 1 Some pictures of protoplast release under microscope

2.2 单因素实验结果

2.2.1 菌丝体菌龄对原生质体制备的影响

由图 2：A 可知，巨大侧耳的原生质体产量，随菌龄的增加，呈现先上升后下降的趋势。在 5 d 时，PG46 和 PG79 的原生质体产量均达到最高，分别为 4.82×10^6 CFU·mL^{-1} 和 2.74×10^6 CFU·mL^{-1}，且与其他菌龄的产量差异显著；菌龄超过 5 d 后，原生质体产量下降，特别是

11 d 时原生质体产量最低，且低于最开始 3 d 的产量，分别为 0.62×10^6 CFU·mL^{-1} 和 0.86×10^6 CFU·mL^{-1}。综上，两菌株制备原生质体的菌丝体最适菌龄为 5 d。

2.2.2 稳渗剂种类对原生质体制备的影响

由图 2：B 可知，不同稳渗剂中，PG46 的原生质体产量由高到低依次为甘露醇>山梨醇>蔗糖>硫酸镁>氯化钾，最高产量为 2.74×10^6 CFU·mL^{-1}，其中甘露醇、山梨醇和蔗糖三者中的原生质体产量无显著差异，但均显著高于硫酸镁和氯化钾；PG79 的原生质体产量由高到低依次为蔗糖>甘露醇>山梨醇>氯化钾>硫酸镁，最高产量为 1.88×10^6 CFU·mL^{-1}，前三者产量无显著差异，但均显著高于硫酸镁和氯化钾的。可见，稳渗剂类别对 PG46 和 PG79 的原生质体产量影响显著，有机糖醇类稳渗剂甘露醇、山梨醇和蔗糖均为制备巨大侧耳原生质体的适宜稳渗剂。

2.2.3 溶壁酶浓度对原生质体制备的影响

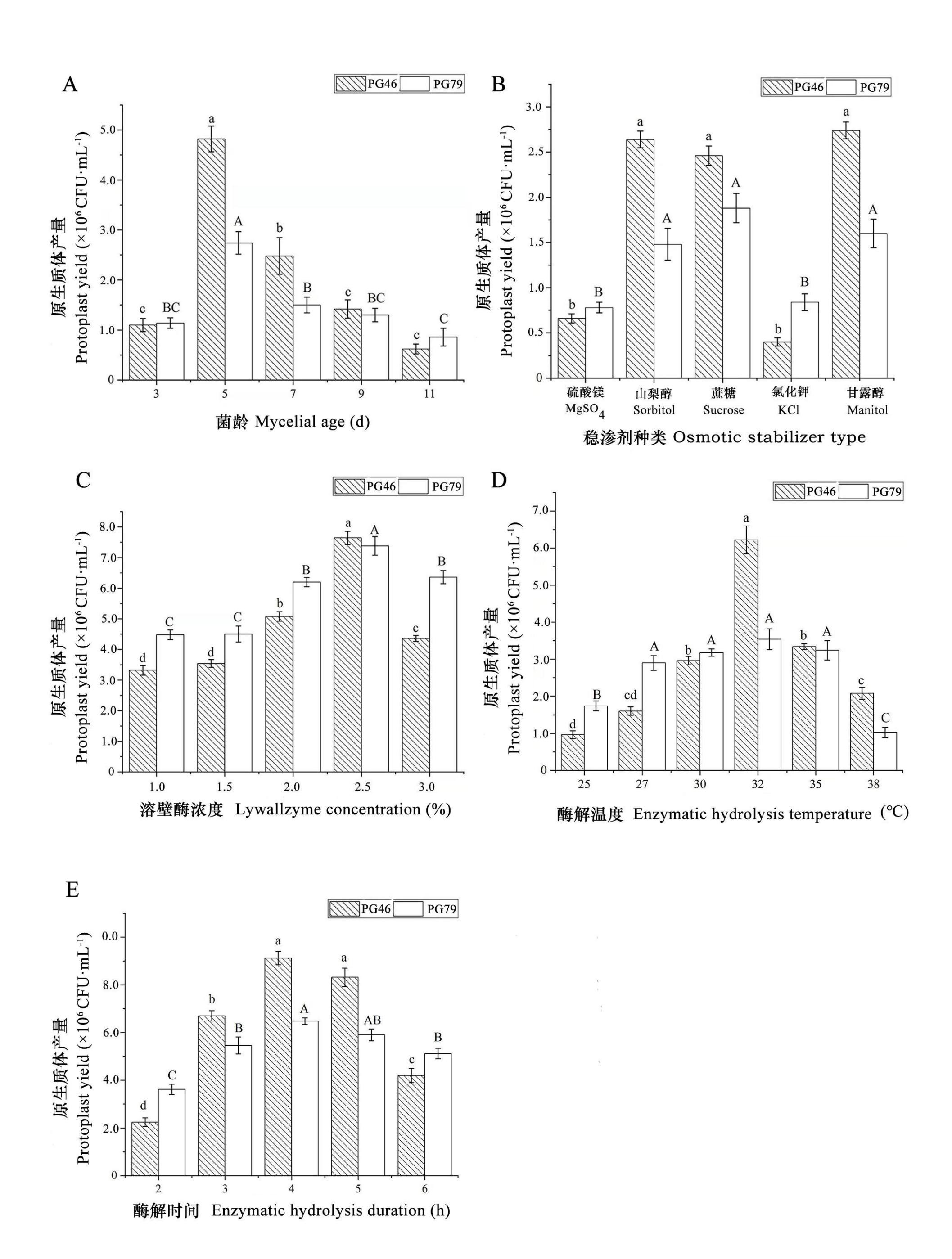
由图 2：C 可知，随着溶壁酶浓度的增加，PG46 和 PG79 的原生质体产量先增加后降低。当溶壁酶浓度为 2.5%时，两菌株的原生质体产量均达到最高，分别为 7.64×10^6 CFU·mL^{-1} 和 7.38×10^6 CFU·mL^{-1}；当浓度为 3.0%时，原生质体产量下降，且与 2.5%浓度的原生质体产量具有显著差异。可见，制备巨大侧耳原生质体的最适溶壁酶浓度为 2.5%。

2.2.4 酶解温度对原生质体制备的影响

由图 2：D 可知，随酶解温度的升高，PG46 和 PG79 的原生质体产量呈现先增加后降低的趋势。当酶解温度为 32 ℃时，PG46 的原生质体产量达到最高，为 6.22×10^6 CFU·mL^{-1}，且与其他酶解温度水平差异显著；PG79 的原生质体产量，也在 32 ℃时达到最高，为 3.54×10^6 CFU·mL^{-1}，但与 27、30、35 ℃的原生质体产量无显著差异。综上，PG46 原生质体制备的最适酶解温度为 32 ℃，PG79 原生质体制备的适宜酶解温度较广，为 27~35 ℃。

2.2.5 酶解时间对原生质体制备的影响

由图 2：E 可知，PG46 和 PG79 的原生质体产量，随酶解时间的增加呈先上升后下降的趋势。当酶解时间为 4 h 时，两菌株的原生质体产量均达到最高，分别为 9.12×10^6 CFU·mL^{-1} 和 6.48×10^6 CFU·mL^{-1}，但均与酶解时间 5 h 无显著差异；当酶解时间大于 5 h 时，原生质体产量显著下降。因此，4~5 h 为制备巨大侧耳原生质体的适宜酶解时间。



A. 菌龄；**B**. 稳渗剂种类；**C**. 溶壁酶浓度；**D**. 酶解温度；**E**. 酶解时间。不同小写字母、大写字母分别表示对 PG46、PG79 的原生质体产量有显著差异（P<0.05）.

A. Mycelial age; **B**. Osmotic stabilizer type; **C**. Lywallzyme concentration; **D**. Enzymatic hydrolysis temperature; **E**. Enzymatic hydrolysis duration. Different lowercase letters and capital letters indicate significant differences for protoplast yield of PG46 and PG79, respectively (P<0.05).

图 2 不同因素对两株巨大侧耳菌株原生质体产量的影响

Fig. 2 Effects of various factors on protoplast yield of two *Pleurotus giganteus* strains

2.3 正交试验交互作用分析结果

为探究不同因素对原生质体制备的交互影响，采用正交试验的方法，进一步探究制备巨大侧耳原生质体的最适条件。由表 3 可知，9 种正交组合均可用于 PG46 的原生质体制备和再生。其中，原生质体得率最高的为组合 2（菌龄 5 d，溶壁酶浓度 2.5%，0.6 mol·L^{-1} 的甘露醇，32 ℃酶解 4 h），得率高达 11.22×10^{6} CFU·mL^{-1}，显著高于其他组合。原生质体再生

率最高的为组合 1（菌龄 5 d，溶壁酶浓度 2.0%，0.6 mol·L^{-1} 的甘露醇，30 ℃酶解 3 h），再生率达 1.20%。可见，PG46 原生质体再生与原生质体制备的最适条件存在一定差异。由表 4 可知，4 个主要因素对 PG46 原生质体制备的影响程度大小依次为菌龄>溶壁酶浓度>酶解温度>酶解时间，且各因素影响差异极显著（*P*<0.001）。

表 3　PG46 菌株的正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal experimental for PG46 strain

组合 Combination	菌龄 Mycelial age	溶壁酶浓度 Lywallzyme concentration	酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature	酶解时间 Enzymatic hydrolysis duration	原生质体产量 Protoplast yield ($\times10^6$ CFU·mL^{-1})	原生质体再生率 Protoplast regeneration rate (%)
1	1	1	1	1	3.78±0.97c	1.20
2	1	2	2	2	11.22±0.97a	1.15
3	1	3	3	3	8.24±0.63b	0.25
4	2	1	3	2	2.94±0.50cd	0.10
5	2	2	1	3	2.54±0.89cd	0.05
6	2	3	2	1	2.58±0.77cd	0.20
7	3	1	2	3	1.72±0.31d	0.50
8	3	2	3	1	3.92±0.99c	1.10
9	3	3	1	2	1.56±0.67d	0.60
K1	23.24	8.44	7.88	10.28		
K2	8.06	17.68	15.52	15.72		
K3	7.20	12.38	15.10	12.50		
k1	7.73	2.81	2.63	3.43		
k2	2.69	5.89	5.17	5.23		
k3	2.40	4.13	5.03	4.17		
R	5.33	3.08	2.54	1.80		
主次顺序 Primary and secondary order	A＞B＞C＞D					
最优水平 Optimal level	A1	B2	C2	D2		
最优组合 Optimal combination	A1B2C2D2					

注：大写字母 A、B、C、D 分别表示菌龄、溶壁酶浓度、酶解温度和酶解时间 4 个因素；数字 1、2、3 分别表示对应因素的 3 个水平；小写字母 a、b、c、d 表示原生质体产量有显著差异（*P*<0.05）。下同。

Note: The capital letters A, B, C and D indicate four factors, mycelial age, lywallzyme concentration, enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis duration, respectively; The numbers 1, 2 and 3 indicate the three levels of corresponding factors, respectively; The lowercase letters a, b, c, d indicate significant differences for protoplast yield (*P*<0.05). The same below.

表 4　PG46 菌株的方差分析

Table 4 Variance analysis of PG46 strain

来源 Source	III 型平方和 Sum of squares	自由度 *Df*	*F*	*P*
菌龄 Mycelial age	271.363	2	224.804	0.000
溶壁酶浓度 Lywallzyme concentration	71.662	2	59.366	0.000
酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature	61.486	2	50.936	0.000
酶解时间 Enzymatic hydrolysis duration	24.939	2	20.660	0.000
误差 Error	21.728	36		
总计 Total	1 274.650	45		

由表 5 可知，9 种正交组合均可用于 PG79 的原生质体制备，但部分组合不适宜其原生质体再生。其中，PG79 原生质体得率最高的为组合 3（菌龄 5 d，溶壁酶浓度 3.0%，0.6 $mol\cdot L^{-1}$ 的甘露醇，35 ℃酶解 5 h），得率高达 7.28×10^6 $CFU\cdot mL^{-1}$，但与组合 1 和组合 2 的原生质体得率无显著差异。原生质体再生率最高的为组合 1（菌龄 5 d，溶壁酶浓度 2.0%，0.6 $mol\cdot L^{-1}$ 的甘露醇，30 ℃酶解 3 h），再生率为 0.45%。但是，在原生质体最适制备条件下，原生质体再生率为 0。由表 6 可知，各因素对 PG79 原生质体制备的影响程度依次为菌龄>酶解时间>酶解温度>溶壁酶浓度，且各因素影响差异显著（$P< 0.05$）。

表 5 PG79 菌株的正交试验结果

Table 5 Results of orthogonal experimental for PG79 strain

组合 Combination	菌龄 Mycelial age	溶壁酶浓度 Lywallzyme concentration	酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature	酶解时间 Enzymatic hydrolysis duration	原生质体产量 Protoplast yield ($\times10^6$ $CFU\cdot mL^{-1}$)	原生质体再生率 Protoplast regeneration rate (%)
1	1	1	1	1	6.98±0.79a	0.45
2	1	2	2	2	5.62±1.06ab	0.20
3	1	3	3	3	7.28±1.69a	0.00
4	2	1	3	2	3.52±0.95cd	0.10
5	2	2	1	3	4.46±1.10bcd	0.05
6	2	3	2	1	4.86±0.42bc	0.25
7	3	1	2	3	1.56±1.11e	0.00
8	3	2	3	1	4.68±0.81bc	0.00
9	3	3	1	2	2.68±0.82de	0.00
K1	19.88	12.06	14.12	16.52		
K2	12.84	14.76	12.04	11.82		
K3	8.92	14.82	15.48	13.30		
k1	6.63	4.03	4.71	5.51		
k2	4.28	4.92	4.01	3.94		
k3	2.97	4.94	5.16	4.43		
R	3.66	0.91	1.15	1.57		
主次顺序			A>D>C>B			

Primary and secondary order				
最优水平 Optimal level	A1	B3	C3	D1
最优组合 Optimal combination			A1B3C3D1	

表 6　PG79 菌株的方差分析

Table 6 Variance analysis of PG79 strain

来源 Source	III 型平方和 Sum of squares	自由度 *Df*	*F*	*P*
菌龄 Mycelial age	102.805	2	48.898	0.000
溶壁酶浓度 Lywallzyme concentration	8.284	2	3.940	0.028
酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature	10.005	2	4.759	0.015
酶解时间 Enzymatic hydrolysis duration	19.249	2	9.156	0.001
误差 Error	37.844	36		
总计 Total	1 141.460	45		

3 讨论与结论

本研究采用单因素实验和正交试验的方法，对 2 株不同温型的巨大侧耳菌株原生质体制备的关键因素（菌丝体菌龄、稳渗剂种类、溶壁酶浓度、酶解温度和酶解时间）进行优化，以期明确巨大侧耳原生质体制备的适宜条件。结果表明，两菌株原生质体制备的最适条件基本一致，均在组合 2（菌龄 5 d，溶壁酶浓度 2.5%，0.6 mol·L^{-1} 甘露醇，32 ℃酶解 4 h）的条件下获得最高原生质体产量，且显著高于单因素实验结果。同时也说明，各影响因素间存在一定的交互作用，在进行条件优化时不可忽略。*F*-test 分析显示，菌丝体菌龄对两株巨大侧耳菌株的原生质体产量影响均为极显著，但溶壁酶浓度、酶解温度和酶解时间对两菌株的影响程度存在差异。推测是由于巨大侧耳的遗传多样性丰富，PG46 和 PG79 菌株间产生了遗传分化（Dai et al., 2019）。

菌株的生理状态和不同的酶解条件，对食用菌原生质体产量和质量都具有不同程度的影响（孙佳星等，2022）。在本研究中，菌丝体的菌龄，是影响巨大侧耳原生质体制备的最主要因素。不同时期的菌丝体，细胞壁厚度和生长活力不同，对溶壁酶的敏感性也存在差异（张文学等，2003）。在菌丝生长前期，细胞壁较薄，更易被溶壁酶降解；随着菌龄的继续增加，细胞壁逐渐加厚且产生的次生物质增多，酶解效率降低，进而导致原生质体产量下降（Kim et al., 2000）。本研究前期对巨大侧耳菌丝体培养时，发现第 5 d 正是巨大侧耳菌丝体生长的指数生长期，此时细胞壁厚度和菌丝体活力均适宜，可作为原生质体制备的理想时期和材料。

由于原生质体失去了细胞壁，对外界环境十分敏感，稳渗剂可保持原生质体内外的压力平衡，避免其破裂或皱缩（Pasternak et al., 2002）。同时，稳渗剂在细胞与溶壁酶的反应中

起媒介作用，其性质影响溶壁酶的反应活性，因此稳渗剂的选择非常重要（刘玉霞等，2009）。本研究中，以甘露醇、山梨醇和蔗糖为稳渗剂时原生质体产量均较高，且显著高于硫酸镁和氯化钾。前人研究也发现，有机糖醇稳渗剂和无机盐稳渗剂在食用菌原生质体制备中影响差异很大（邹彰毅等，2020；孙佳星等，2022）。产生的这一结果，可能是因为有机糖醇不仅能维持渗透压平衡，还能促进酶与底物的结合，进而提高了酶促反应的产量（谭文辉等，2006）。

酶解液是裂解细胞壁，获得原生质体的关键，酶的类型和浓度可以影响原生质体的活力和数量（Kanchanapoom & Jantaro, 2001）。前人研究发现，单一的溶壁酶适合多种食用菌的原生质体制备，在保证较高效率的同时成本也较低（李光环，2018）。但由于不同真菌的细胞壁组成和结构不同，不同浓度的溶壁酶的酶解效果也会有所差异。本研究结果表明，在一定范围内，酶解液浓度越高，原生质体产量越高，但浓度超过 2.5%后，原生质体产量开始下降。这可能是因为酶浓度过高会对原生质体的膜造成影响，使得细胞脱壁太彻底，后期也会影响原生质体的再生（孙剑秋和周东波，2002）。

在相同的溶壁酶浓度下，酶解温度和酶解时间是影响破壁效果的关键。根据酶反应的动力学原理，酶解温度直接影响酶促反应的速度，还会影响细胞壁的生理状态，适宜的酶解温度有助于溶壁酶发挥最佳的裂解作用。本研究中，32 ℃为两菌株的最适酶解温度，低于该温度时需适当延长酶解时间来获得较高的原生质体产量，高于该温度时原生质体产量下降且再生率也降低。可能是因为温度过低时，酶活力不足，且菌丝生理代谢慢，导致酶解反应较慢；温度过高，会破坏酶的稳定性，降低溶壁酶活性和损伤已游离的原生质体，进一步影响细胞再生率（张丽霞和郭成金，2008；贺婷和郭成金，2012）。另一方面，酶解时间可以影响酶促反应的程度，适当延长酶解时间可获得较高的原生质体释放量。本研究中，两菌株的最适酶解时间均为 4 h，超过 4 h 原生质体产量开始下降。推测是因为失去细胞壁的原生质体稳定性下降，由于酶的作用及渗透作用，酶解时间过长会导致原生质体破裂。并且，原生质体再生时需要一定量的细胞壁酶解残余物，酶解时间过长会导致酶解残余物过少甚至消失（郭成金和赵润，2009）。王昱等（2013）研究也发现，酶解时间过长，较早释放出的原生质体无细胞壁保护而破裂，其活性下降难于再生。因此，适宜的酶解时间尤为重要。

综上，两株不同温型巨大侧耳菌株的原生质体制备的最适条件相同，但各因素对两菌株原生质体产量的影响不同。因此，在制备巨大侧耳不同菌株的原生质体时，应按照各菌株情况和实验需求进行适当调整。该研究结果，可为后续的巨大侧耳杂交育种、遗传转化、全基因组测序等工作奠定基础，有利于推动巨大侧耳产业的发展。

参考文献：

CUI WJ, ZHAO YD, SONG B, et al., 2019. Optimization of protoplast preparation of *Auricularia cornea* (Yumuer) and variation detection of regenerated strain [J]. Mol Plant Breed, 17(18): 6006-6012. [崔玮洁，赵一橦，宋冰，等，2019. 玉木耳原生质体制备条件的优化及再生菌株的变异检测[J]. 分子植物育种，17(18)：6006-6012.]

DAI YT, SU WY, YANG CT, et al., 2017. Development of novel polymorphic EST-SSR markers in Bailinggu (*Pleurotus tuoliensis*) for crossbreeding [J]. Genes, 8(11): 325.

DAI YT, SUN L, YIN XL, et al., 2019. *Pleurotus eryngii* genomes reveal evolution and adaptation to the gobi desert environment [J]. Front Microbiol, 10: 2024.

DONG HX, CAI DH, LI Y, 2010. Analysis of mating types of basidiospores in *Panus giganteus* [J]. Microbiol Chin, 37(11): 1617-1620. [董洪新，蔡德华，李玉，2010. 猪肚菇担孢子交配型的分析[J]. 微生物学通报，37(11)：1617-1620.]

GUO CJ, ZHAO R, 2009. Study on protoplast preparation and regeneration of *Cordyces sinensis*

[J]. Food Sci, 30(5): 166-170. [郭成金，赵润，2009. 冬虫夏草原生质体制备与再生条件的研究[J]. 食品科学，30(5)：166-170.]

HE T, GUO CJ, 2012. Research on protoplast preparation and regeneration conditions of *Tremella aurantialba* [J]. J Anhui Agric Sci, 40(3): 1374-1376. [贺婷，郭成金，2012. 金耳原生质体制备与再生研究[J]. 安徽农业科学，40(3)：1374-1376.]

KANCHANAPOOM K, JANTARO S, 2001. Isolation and fusion of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium* pompadour [J]. Scienceasia, 27(1): 29-34.

KARUNARATHNA SC, YANG ZL, KO TWK, et al., 2012. *Lentinus giganteus* revisited: new collections from Sri Lanka and Thailand [J]. Mycotaxon, 118(1): 57–71.

KIM BK, KANG JH, JIN M, et al., 2000. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus* [J]. Life Sci, 66(14): 1359-1367.

LI GH, 2018. Study on protoplast preparation regeneration and fusion of different *Pleurotus* varieties [D]. Handan: Hebei University of Engineering: 1-60. [李光环，2018. 侧耳属不同品种原生质体制备再生及融合技术的应用研究[D]. 邯郸：河北工程大学：1-60.]

LIU HJ, 2021. Study on purification and rejuvenation of protoplast of *Pleurotus nebrodensis* and optimization of liquid fermentation conditions [D]. Handan: Hebei University of Engineering: 1-71. [刘海娟，2021. 白灵菇原生质体提纯复壮及液体发酵条件优化研究[D]. 邯郸：河北工程大学：1-71.]

LIU YX, WANG Q, CHEN RL, et al., 2009. Study on protoplast preparation and regeneration of *Pleurotus nebrodensis* [J]. Edib Fungi, 31(4): 24-25. [刘玉霞，王谦，陈瑞玲，等，2009. 白灵菇原生质体制备及再生的研究[J]. 食用菌，31(4): 24-25.]

MURALLIDHAR RV, PANDA T, 2000. Fungal protoplast fusion—a revisit [J]. Bioproc Biosyst Eng, 22(5): 429-431.

PARAVAMSIVAM P, HENG CK, MALEK SN, et al., 2016. Giant oyster mushroom *Pleurotus giganteus* (Agaricomycetes) enhances adipocyte differentiation and glucose uptake via activation of PPARγ and glucose transporters 1 and 4 in 3T3-L1 cells [J]. Int J Med Mushrooms, 18(9): 821-831.

PASTERNAK TP, PRINSEN E, AYAYDIN F, et al., 2002. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa [J]. Plant Physiol, 129(4): 1807-19.

PENG ZH, ZENG GW, SHOU CX, 2000. A study on the construction of protoplast regenerating strains in a wild mushroom *Clitocybe maxima* [J]. Acta Hort Sin, 27(3): 193-197. [彭智华，曾广文，寿诚学，2000. 大杯蕈原生质体菌株筛选的研究[J]. 园艺学报，27(3): 193-197.]

PHAN CW, DAVID P, TAN YS, et al., 2014. Intrastrain comparison of the chemical composition and antioxidant activity of an edible mushroom, *Pleurotus giganteus*, and its potent neuritogenic properties [J]. Sci World J, 2014: 378651.

RAMAN J, JANG KY, OH YL, et al., 2021. Interspecific hybridization between *Ganoderma lingzhi* and *G. applanatum* through protoplast fusion [J]. World J Microbiol Biotechnol, 37(7): 114.

SU WY, YANG HC, TAN YL, et al., 2020. Optimization of protoplast formation of *Auricularia cornea* by response surface methodolog [J]. J S Agric, 51(1): 169-175. [苏文英，杨和川，谭一罗，等，2020. 响应面法优化玉木耳原生质体制备条件[J]. 南方农业学报，51(1)：169-175.]

SUGANO SS, SUZUKI H, SHIMOKITA E, et al., 2017. Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput

transformation system [J]. Sci Rep, 7(1): 1260.
SUN JQ, ZHOU DP, 2002. Microbial protoplast technology [J]. Bull Biol, 37(7): 9-11. [孙剑秋，周东坡，2002. 微生物原生质体技术[J]. 生物学通报，37（7）：9-11.]
SUN JX, YANG H, SUN XD, et al., 2022. Optimization of *Lentinula edodes* protoplast producing conditions based on response surface methodology [J]. Mycosystema, 41(5): 837-846. [孙佳星，杨红，孙晓东，等，2022. 基于响应面法对香菇原生质体制备条件的优化[J]. 菌物学报，41(5)：837-846.]
TAN WH, LI YP, XU Y, 2006. Factors affect the formation and regeneration of protoplasts of microorganism [J]. Mod Food Sci Technol, 22(3): 263-265. [谭文辉，李燕萍，许杨，2006. 微生物原生质体制备及再生的影响因素[J]. 现代食品科技，22（3）：263-265.]
WANG Y, WNAG Y, WANG KY, et al., 2013. Study on preparation and regeneration of the protoplasts from *Ganoderma lucidum* [J]. N Hortic, (16): 184-188. [王昱，王义，王康宇，等，2013. 灵芝原生质体的制备与再生研究[J]. 北方园艺，（16）：184-188.]
WU BJ, 2020. Current situation and prospect of *Panus giganteus* research [J]. J Anhui Agric Sci, 48(22): 25-27. [吴碧君，2020. 巨大革耳研究现状及展望[J]. 安徽农业科学，48(22)：25-27.]
YU HL, ZHAI DD, SHEN XF, et al., 2021. Variation and probability classification of fruiting body quantitative characteristics in *Pleurotus giganteus* germplasm resources [J]. Acta Edul Fungi, 28(2): 42-47. [于海龙，翟丹丹，沈秀芬，等，2021. 猪肚菇种质资源子实体数量性状变异及概率分级[J]. 食用菌学报，28(2)：42-47.]
ZHANG LX, GUO JC, 2008. Study on protoplast preparation and regeneration of *Grifola umbellate* (Pers.) Fries [J]. Edib Fungi Chin, 27(5): 35-37. [张丽霞，郭成金，2008. 猪苓原生质体制备与再生条件的研究[J]. 中国食用菌，27（5）: 35-37.]
ZHANG WX, LIU CL, JIANG H, 2003. Screening of higher enzyme activity strain with protoplast fusion and mutagenisis [J]. J Sichuan Univ, 35(6): 66-70. [张文学，刘春莉，蒋宏，2003. 利用原生质体融合和诱变育种技术选育高酶活菌株[J]. 四川大学学报，35（6）：66-70.]
ZOU ZY, DENG BW, 2020. Optimization of protoplast preparation and regeneration conditions of *Agarics blazei* [J]. N Hortic, (3): 128-137. [邹彰毅，邓百万，2020. 姬松茸原生质体制备及再生条件优化[J]. 北方园艺，（3）：128-137.]